Aus der Hautklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Wilhelm Schneider

Prüfung verschiedener Corticosteroide an Albino - Meerschweinchen und Vergleich mit parallellaufende Versuchen an menschlicher Haut

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Eberhard – Karls – Universität
zu Tübingen

vorgelegt
von

Klaus - Jürgen Welcker
aus Glauchau / Sa

1969

Aus der Hautklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Wilhelm Schneider

Prüfung verschiedener Corticosteroide an Albino-Meerschweinchen und Vergleich mit parallellaufenden Versuchen an menschlicher Haut

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt
von
Klaus-Jürgen Welcker
aus Glauchau/Sa

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Tronnier
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Schneider

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

In Dankbarkeit meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung und Problemstellung

II Methodik
- a.) Wahl des Entzündungsmodells
- b.) Art der Sensibilisierung der Versuchstiere
- c.) Prinzip der getrennten Erfassung von Vasokonstiktion und Entzündungshemmung
- d.) Versuchsanordnung
- e.) Präparate

III Ergebnisse
- 1.) Bestimmung des vasokonstiktorischen Effektes
  - a.) Werte für Temperaturerniedrigung
  - b.) Werte für Zunahme der modifizierten Wärmeleitzahl
  - c.) Zusammenfassung des Ergebnisses
- 2.) Bestimmung des entzündungshemmenden Effektes
  - a.) Werte der Temperaturmessung
  - b.) Werte der modifizierten Wärmeleitzahlmessung
  - c.) Zusammenfassung des Ergebnisses
- 3.) Schlußergebnis

IV Diskussion

V Zusammenfassung

VI Literaturverzeichnis

Einleitung und Problemstellung

Im Hinblick auf die immer größer werdende Zahl neuentwickelter Corticosteroidpräparate zur lokalen Applikation ergibt sich für Klinik und pharmazeutische Industrie immer wieder die Notwendigkeit der vergleichenden Prüfung ihrer therapeutischen Wirksamkeit. Insbesondere für die pharmazeutische Industrie wäre es interessant, anhand von Tierversuchen eine Möglichkeit zu finden, die es ihr erlaubt, die langwierigen und von vielen Faktoren abhängigen klinischen Untersuchungen zu verkürzen und mit großangelegten Serien eine Genauigkeit der Prüfung und Vielzahl vergleichender Tests zu erreichen, die bisher nicht möglich war.
Es stellen sich am Anfang mehrere prinzipielle Fragen zur Ausführung:

1. Ist eine objektive Methode quantitativer Aussage zur Untersuchung und zum Vergleich mehrerer Corticosteroide bekannt?
2. Ist eine Übertragung dieser Methode auf den Tierversuch möglich?
3. Welches Tier bietet annähernd gleiche Hautverhältnisse und Hautreaktionen wie das menschliche Hautorgan?
4. Lassen sich Vergleiche zum Parallelversuch an menschlicher Haut ziehen? (4)

Die Durchsicht der Literatur macht die ganze Problematik dieser Untersuchung deutlich. Dem Rechts-Links Vergleich (14) haftet der Nachteil eines nicht immer zu umgehenden Erwartungswertes des Beobachters an (38). Es lassen sich damit auf keinen Fall objektive Ergebnisse erzielen.
HAXTHAUSEN (12) untersuchte mittels der elektrophoretischen Läppchenprobe, die es mit Hilfe von galvanischem Strom ermöglicht, das spezifische Allergen in die Haut von Ekzematikern einzuführen und ekzematöse Reaktionen hervorzurufen, die verschiedenen Hemmwirkungen von Cortisonsalben. Weitere Testarten werden von TRONNIER angegeben (36) : UV-Erytheme, mit Hilfe der Wucherpfennigschen Lichttreppe angelegt, werden durch zu testende Corticosteroide abgeschwächt.
Akanthose-Tests - modifiziert nach HEITE und ROMMEL (15) - wurden an Meerschweinchen ausgeführt, wobei die einzelnen Hautfelder nach Behandlung mit Corticosteroiden excidiert und auf ihre Epidermisdicke untersucht wurden. Häufig wird auch der Weg der experimentellen Entzündung durch Nicotinsäureestern und das Aufbringen von Cantharidinpflaster (11) und deren Abschwächung durch Steroide beschritten.

Differenziert man nun diese verschiedenen Testarten auf ihren spezi-

ellen Wert für unsere Versuchsaufgaben, so wird außer bei dem Rechts-Links-Versuch ein Entzündungsmodell verwendet, bei dem vor allem die Gefäßreaktion zur Beurteilung herangezogen wird. Bei dem von McKENZIE angegebenen Test (20) prüft man die vasokonstriktorische Wirkung der Corticosteroide. Fraglich jedoch ist, ob diese überhaupt identisch oder parallel - wie McKENZIE (11) berichtet - mit der allgemeinen Entzündungshemmung einhergeht. HEINECKE (13) zeigt diese Problematik eindrucksvoll auf. Der Grad der Vasokonstriktion ist ja sowohl von der Penetration und damit von dem Zustand der Haut und der Grundlage abhängig, andererseits von dem vasokonstriktorischem Effekt der Verbindung selbst. Außerdem dürfte die Vasokonstriktion nicht allein verantwortlich für die Wirkung der Corticosteroide sein, da zum Beispiel Medikamente mit nur vasokonstriktorischem Effekt nicht den gleichen therapeutischen Erfolg zeigen wie die Corticosteroide. Wir bedienten uns deshalb eines besonderen Entzündungsmodelles, auf das später eingegangen wird.

Verschiedene Untersuchungen zur Problematik der verschiedenen Tierarten und der Analogie zwischen menschlichem und tierischem Hautorgan - wie die von MONTAGNA (21) - zeigen, daß beträchtliche Unterschiede zwischen der Haut des Menschen und zum Beispiel der des Hausschweines, besonders im Hinblick auf den hohen Gehalt der Schweineepidermis an alkalischer Phosphatase und einer geringen Vaskularisierung der Dermis bestehen. KLASCHKA (17) zeigt auf, daß nach intraperitonealer Sensibilisierung und epicutaner Auslösung des Kontaktekzems an Meerschweinchen auch bei hochgradiger cutaner Reaktion keine Bläschenbildung oder deutliche Spongiosebildung der Epidermis beobachtet werden konnte, wie sie unter gleichen Bedingungen beim Menschen auftritt. Epidermale Reaktionen treten in den Hintergrund. Es stellt sich deshalb die Frage, ob ein so entstehender Entzündungsprozeß der Meerschweinchenhaut als "cutanes Ekzem" dem üblichen epidermalen Ekzem gegenüber gestellt werden kann. Ebenso weisen weitere Autoren darauf hin (22), daß pharmakodynamische Untersuchungen mit größter Kritik auszuführen seien, da sich die Haut der Meerschweinchen anatomisch, morphologisch und funktionell anders als die menschliche Haut verhalte. Außerdem besitzt das Meerschweinchenepithel eine weniger entwickelte Schutzfunktion als die menschliche Epidermis. Infolgedessen sind schon mindestens die Ergebnisse der "allergischen" Tests an der Meerschweinchenhaut nicht oder nur unter Vorbehalt mit der Reaktion der menschlichen Haut vergleichbar. Es muß demnach fraglich erscheinen, ob die Meerschweinchenhaut überhaupt zu einer Acan-

those als einer Reaktion auf einen pharmakodynamischen Effekt fähig ist.
Andererseits läßt sich den Untersuchungen weiterer Autoren entnehmen, daß dem Meerschweinchen - von allen in Frage kommenden Tierspezies - ein Integument zugesprochen werden kann, das dem des Menschen doch am nächsten kommt. HUNZIGER und JADASSOHN (16), ebenso STORCK (34), konnten nach histologischen Untersuchungen aufzeigen, daß das DNCB-Kontaktekzem des Meerschweinchens Bilder ergibt, die dem Kontaktekzem des Menschen sehr ähnlich sind, allerdings mit der lokalen Beschränkung auf die Meerschweinchenzitze und auf die akanthotisch vorbehandelte Flanke.
Wir stellten weiterhin fest, daß unsere Problemstellung bisher noch nicht behandelt oder ausgeführt wurde, mit Ausnahme der von SCHENK und HEITE veröffentlichten Arbeit (26), die sich aber in Abweichung von uns mit Corticosteroiden in Salbengrundlagen - wir verwendeten Alkohollösungen als Carrier - beschäftigt haben und als Testobjekt eine besonders gezüchtete Schweineart verwandten, während wir Meerschweinchen benutzten.

Methodik

Als Versuchstiere dienten uns Albino-Meerschweinchen, deren Hautorgan uns trotz aller in Untersuchungen angeführten Bedenken noch am besten für unsere Versuche geeignet erschien. Wir griffen auf das Prinzip der epicutanen Sensibilisierung mit Dinitrochlorbenzol zurück, das wir nach Berücksichtigung der Literatur - J.R. FREY, A. SCHNITZER u.a. (40 / 7 / 28 / 8) berichten darüber ausführlich - mithin als das am geeignetsten wählten. Bei unseren Versuchen gingen wir nach der Methode von M.A. STEVENS (32) vor, der spezielle Sensibilisierungsversuche mit DNCB an Albino-Meerschweinchen durchführte.

Zur Erfassung der Entzündungshemmung wählten wir das Kontaktekzem, da es alle Forderungen in klinischer und histologischer Hinsicht einschließt, die man an ein Modell zur Prüfung lokal applizierbarer Corticosteroide stellt (27,29). Es wird weitestens dem Wirkungsspektrum der Steroide gerecht, da sich diese ja nicht nur durch eine antientzündliche, sondern auch durch eine antiallergische Wirkung auszeichnen. Somit wird ein Nachteil jener vorher beschriebenen Testmethoden umgangen, die nur auf einer Abschwächung toxisch-entzündlicher Reaktionen beruhen und damit diese speziellen Faktoren der Corticosteroide vernachlässigen.
Dies scheint insofern wichtig, als sich die durch obligat-toxische Sub-

stanzen hervorgerufene Entzündung beim Meerschweinchen weitgehend histologisch von dem primär nicht toxischen Kontaktekzem unterscheidet, während sie makroskopisch nicht zu differenzieren ist (9). So stellte BORELLI und auch CHARPY (5/6) bei allergischen Testreaktionen keine Veränderungen im Stratum corneum fest, dagegen eine Entwicklung der Reaktion der Oberfläche zu. Bei toxischen Reaktionen zeigte sich eine Veränderung im Stratum corneum und eine zur Oberfläche hin abnehmende Entwicklung der Reaktion.

In der Methodik der Applikation von Corticosteroiden und Allergenen bezogen wir uns auf HAXTHAUSEN (12). Die Allergene wurden allerdings nicht mit Hilfe der Elektrophorese aufgebracht, sondern manuell. Zur metrischen Erfassung der Wirkung der einzelnen Therapeutica diente uns das von TRONNIER (37) entwickelte Prinzip der getrennten Erfassung von Vasokonstriktion einerseits und Entzündungshemmung andererseits. Zur Vasokonstriktionsmessung der oberflächlichen, vor allem aber der Hautgefäße im mittleren und unteren Corium dienten uns die modifizierte Wärmeleitfähigkeit WLF (Zeit in Sekunden, um einen Fühler von 25° Celsius auf 29° zu erwärmen, Femia Mehrzweckgerät) und die Bestimmung der Hauttemperatur T, gemessen mit dem üblichen Metall-Meßfühler in Verbindung mit einem angeschlossenen Galvanometer.

Im obengenannten TRONNIERschen Prinzip werden in einer ersten Versuchsserie eine Anzahl unbehandelter Hautfelder gemessen. Der Mittelwert ergibt A. Nach längerer Einwirkung daraufhin applizierter Corticosteroide muß sich ein vasokonstriktorischer Effekt ausgebildet haben. Es ergibt sich der neue Wert B. Die Strecke $AB = a_1$ stellt ein Maß für die reine Vasokonstriktion des zu untersuchenden Medikamentes dar.

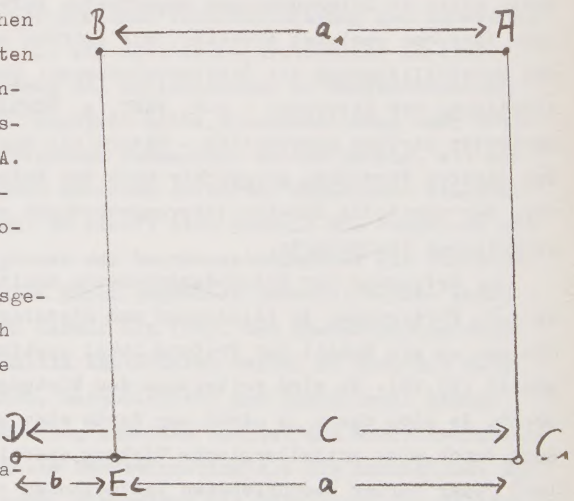

Abb. 1

Legt man nun wieder über längere Zeit ein spezifisches Allergen auf, so ergibt sich an sensibilisierten Versuchspersonen ein Mittelwert C für das reine Kontaktekzem.
Wird die Haut jetzt mit Corticosteroiden vorbehandelt und erst danach mit dem Allergen in Kontakt gebracht, so ergibt sich der Mittelwert D. Unter der fiktiven Annahme, daß der Vasokonstriktion a_1 der gesunden Haut eine gleich große Vasokonstriktion a beim Kontaktekzem entspreche, gelangt man durch einfache Subtraktion der Strecke a_1 von c zu Punkt E. Stimmen die gemessenen Werte von D nicht mit den errechneten Werten von E überein, so läßt sich diese Differenz b nur als spezifisch entzündungshemmende Eigenschaft der Corticosteroide interpretieren.

Versuchsablauf:
In der ersten Versuchsreihe an gesunden Albino-Meerschweinchen - 6 männlich, 12 weiblich - bestimmten wir zunächst den vasokonstriktorischen Effekt der einzelnen Präparate. Jedes der Meerschweinchen wurde zunächst an Rücken, Bauch und Flanken mechanisch geschoren und mit einem chemischen Präparat epiliert. Nach Abklingen der Reizung - ungefähr nach 5 Stunden - wurden auf Rücken, Bauch und Flanken pro Tier 4 kreisrunde, im Durchmesser 2,5 cm messende Felder gestempelt. Diese Anordnung wurde im Verlauf der Versuchsserien soweit wie möglich gleich gelassen. Von jedem Feld wurden WLF und T gemessen.
Bei jedem Versuchstier legten wir noch ein Kontrollfeld an, um Faktoren wie momentane Stoffwechsellage oder Wärmestau unter dem Occlusivverband zu berücksichtigen, deren Einfluß wir von den Versuchstieren nicht fernhalten konnten. Auf dieses Feld wurde bei der ersten Versuchsserie kein Corticosteroid appliziert. Zeigte der nach 24 Stunden gemessene Kontrollwert eine Differenz zu demjenigen der ersten Messung, so konnte der Unterschied nicht auf Vasokonstriktion bzw. Dilatation beruhen, sondern mußte eben in den oben erwähnten Faktoren gesucht werden. Um die Differenz der Kontrollwerte wurden die Meßergebnisse - T und WLF - aller Felder nach 24 Stunden korrigiert.
Weiterhin mußte die schon von STORCK (1949) und STEIN (1956) beschriebene Tatsache der verschiedenen Innervation und Blutversorgung der einzelnen Körperpartien berücksichtigt werden, aus der folgt, daß mit demselben Präparat verschiedene Meßergebnisse in Abhängigkeit von der örtlichen Anwendung erzielt werden können. Bei jedem Versuchstier rückten

wir deshalb mit unseren in genauer Reihenfolge festgelegten Präparaten auf den ebenfalls festgelegten Versuchsfeldern um ein Feld weiter. So gelangte jedes Steroid während des Versuches auf jedes Testfeld einschließlich Kontrollfeld. Dies war insofern besonders wichtig, da es uns aus befestigungstechnischen Gründen nicht möglich war, 2 Felder hintereinander, zum Beispiel an beiden Flanken, anzubringen, und so eine Gleichheit der lokalen Applikation anzustreben. Wurde so verfahren, gerieten die Felder immer in Bereiche der anterioren oder posterioren Extremitätenmuskulatur und eine 24 stündige Ruhigstellung und Abdichtung der Versuchsfelder war nicht gewährleistet, da sich jedes der verwendeten gebräuchlichen Pflaster alsbald abhob und den Tieren die Möglichkeit bot, mit ihren Hinterpfoten den Verband abzuziehen. Es mußte auf die in sich stabilste Befestigungsform zurückgegriffen werden. Das zwang in diesem Fall zur Anordnung der Felder rund um den Körper in der bewegungsärmsten Zone (Rücken, Flanke, Bauch, Flanke) und kreisrundem Anlegen eines Befestigungsmaterials (Leukoplast) in mehreren Windungen, wobei darauf zu achten war, daß das Pflaster nicht zu breit neben dem nicht selbstklebenden Occlusivverband oder dem ebenfalls schwach haftenden Porotestpflaster auf der epilierten Haut der Tiere zu liegen kam, da sich sonst die Pflasterreizung bis ins zu messende Versuchsfeld ausbreitete. Aus der gebotenen Lage und Größe - die nötig war, um je 5 Werte für die Temperatur pro Meßfeld abzulesen und daraus einen Mittelwert zu bilden - der Felder ergab sich zwangsläufig ihre geringe Zahl pro Versuchstier, je eins an Bauch und Rücken und zwei an den Flanken.

Nach der ersten Leermessung wurde auf je ein Feld 0,1 ml der 3 zu prüfenden Corticosteroide aufgebracht und eingerieben. Um auf die Vorteile eines Occlusivverbandes, wie stärkere Maceration und Hydration der Epidermis (35/39), nicht zu verzichten, benützten wir eine nicht klebende Folie, die wir unter Zwischenschaltung von runden Filterpapieren auf die Felder auflegten und an den Rändern unter den oben beschriebenen Rücksichtsmaßnahmen mit Leukoplast abdeckten. Einen normalen selbstklebenden Occlusivverband zu verwenden, war wegen der cutanen Reizung der Meerschweinchenhaut - bis zu deren Verletzung - durch die mechanische Einwirkung beim Abziehen desselben nicht möglich, ohne die Versuchsfelder aufs stärkste zu irritieren und die Meßergebnisse zu verfälschen. Der Occlusivverband wurde 24 Stunden an den Versuchstieren belassen, die

sich während dieser Zeit in Einzelkäfigen befanden. Nach Abheben des Verbandes wurde bis zur Messung von T und WLF eine 3/4 Stunde gewartet, um die hierdurch hervorgerufene Erregung der Tiere und die Pflasterreizung abklingen zu lassen.

Die zweite Versuchsserie zur Erfassung des entzündungshemmenden Faktors wurde prinzipiell ähnlich gestaltet, nur daß die Meerschweinchen vorher cutan sensibilisiert wurden. Während 3 Tagen applizierten wir 4 mal täglich 20 Versuchstiere pro Ohr 0,1 ml einer 1 %igen DNCB-Lösung. Nach einer Woche konnte an 18 Tieren eine positive Hautreaktion durch lokale Aufbringung von 0,1 ml DNCB ausgelöst werden. Für einen weiteren Kontrollwert wurde ein Feld genommen, auf das nur das als Allergen dienende DNCB aufgetragen wurde, nicht aber das Steroid. Hierdurch provozierten wir das Kontaktekzem in seiner vollen Ausprägung und hatten somit einen Anhaltspunkt für die Abschwächung der Reaktion durch die Steroide auf den anderen Feldern gegenüber dem Allergenfeld. 2 Stunden vor Kontakt mit dem Allergen wurden die Corticosteroide auf die Felder aufgetragen, diesmal jedoch zweckmäßigerweise ohne Occlusivverband. Nach 2 Stunden wurden 0,1 ml DNCB auf das nur leicht klebende und daher kaum irritierende Porotestpflaster aufgebracht und auf die Felder geklebt. Darüber legten wir einen Leukoplastverband an. Nach 24 Stunden wurde dieser entfernt und von allen Feldern nach 3/4 stündiger Wartezeit wieder T und WLF gemessen.

Da wir bei 21 Versuchstieren der ersten Untersuchungsreihe nur 3 Versuchsfelder je Tier - das 4. war Kontrollfeld - zur lokalen Applikation der Steroide zur Verfügung hatten, wechselten wir nach Durchlaufen der 4 Versuchsfelder durch die 3 Präparate ein schon appliziertes Corticosteroid gegen ein noch nicht angewendetes aus, wobei immer darauf geachtet wurde, zwei gut wirksame und ein weniger wirksames bzw. umgekehrt im Umlauf zu haben. So kam jedes Präparat 2 mal auf allen Feldern zur Anwendung.

Präparate:

Untersucht wurden insgesamt 4 Präparate, von denen 2 (Nr. 11 und Nr. 13) in dem Parallelversuch von BOES (4) an menschlicher Haut gute Wirkung zeigten und zwei (Nr. 2 und Nr. 3), die weniger gut abschnitten. Es handelte sich um unterschiedliche Steroide mit der gleichen Grundlage (Alkohollösung), die hier der Vollständigkeit halber angeführt werden sollen:

Tabelle 1

Nr.	Präparate	Wirkstoff
2	F 0,025 %	Fluocinolon
3	38637 0,025 %	Prednisolonabkömmling
11	A 41304 0,05 %	Prednisolonabkömmling
13	H 1,0 %	Hydrocortison

Da die Corticosteroide aus den Präparaten der Parallelarbeit von BOES ausgesucht wurden, wollen wir auch hier zur besseren Vergleichsmöglichkeit deren dortige Numerierung beibehalten.
Bei den Präparaten 3 und 11 handelt es sich um an C_6 und C_9 fluorierte Prednisolonabkömmlinge mit zwei unterschiedlich langen Seitenketten am C_{21} Atom.

Ergebnisse

Für die Vasokonstriktion ergaben sich folgende Werte:

1.) Für die Temperaturerniedrigung, wobei T^{o} C die durchschnittliche Temperaturabnahme bei 18 Versuchstieren anzeigt. Auf die Bedeutung von P und N wird anschließend eingegangen.

Tabelle 2

Nr.	Präparate	- T^{o} C	N	Punkte
2	F 0,025 %	0,022	0	0
3	38637 0,025 %	0,072	0,05	17
11	A 41304 0,05 %	0,323	0,30	100
13	H 1,0 %	0,319	0,29	97

2.) Für die Erhöhung der WLF, wobei + WLF die durchschnittliche Zunahme der WLF bei 18 Versuchstieren anzeigt.

Tabelle 3

Nr.	Präparate	+ WLF (sec)	N	Punkte
2	F 0,025 %	-0,731	0	0
3	38637 0,025 %	+ 0,469	1,20	42
11	A 41304 0,05 %	+ 1,900	2,63	94
13	H 1,0 %	+ 2,094	2,81	100

Um eine Aussage über die Vasokonstriktion zu machen, ist wie schon oben erwähnt eine Kombination der beiden Meßwertreihen T und WLF notwendig. Da wir es aber mit verschiedenen Maßsystemen zu tun haben, wurden die gemessenen Werte in ein Punktsystem umgerechnet, und zwar so, daß das in der jeweiligen Meßreihe am besten wirksame Präparat die Punktzahl 100 und das am wenigsten wirksame Präparat die Punktzahl 0 erhielt. Die Meßwerte aller anderen Präparate liegen zwischen diesen beiden, d.h. sie bewegen sich innerhalb einer bestimmten Differenz (D_1) entsprechend 100 Punkten. Mit Hilfe einer Dreisatzrechnung läßt sich jetzt für jedes Präparat die entsprechende Punktzahl errechnen. Wir erhalten die Beziehung:

$$\frac{100}{D_1} \quad \frac{x \text{ Punkte}}{N}$$

wobei N eines Medikamentes die Differenz seiner eigenen Daten zu dem jeweils wirkungsschwächsten Steroid bedeutet. So wird es möglich, die unterschiedlichen Maßsysteme durch Addition der Punkte zusammenzufassen und damit die Wirkung des Steroids zu errechnen.

Faßt man die Ergebnisse der ersten Untersuchungsreihe zusammen, ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 4

Nr.	Präparate	Summe aller Pkt	T	WLF
2	F 0,025 %	0	0	0
3	38637 0,025 %	59	17	42
11	A 41304 0,05 %	194	100	94
13	H 1,0 %	197	97	100

Aus der Tabelle 4 wird ersichtlich, daß Präparat Nr. 13 die stärkste vasokonstriktorische Wirkung zeigt, dicht gefolgt von Präparat Nr. 11, während Steroid Nr. 3 und Nr. 2 die schwächste Wirkung zeigt.

Die Bestimmung des entzündungshemmenden Effektes

Bei dieser Versuchsserie hatten wir 18 sensibilisierte Versuchstiere (2 fielen aus) und jeweils nur zwei Prüffelder zur lokalen Anwendung der Steroide zur Verfügung, da die anderen zwei als Kontrollfelder benutzt wurden.
Corticosteroid Nr. 2 und Nr. 13 kamen somit zweimal über alle 4 Felder zur Anwendung, Präparat Nr. 3 und Nr. 11 nur 1 1/2 mal.
Nach den Erläuterungen auf Seite 4 entstanden die Tabellen 5 und 6.
Positive Werte in den Tabellen zeigen an, daß dem entsprechenden Steroid eine antiinflammatorische und antiallergische Wirkung entspricht. Es wurde nach derselben Rechenmethode verfahren wie bei der ersten Versuchsreihe.

Bestimmung der Entzündungshemmung:

Es ergaben sich folgende Werte:

1. Für die Temperaturmessung

Tabelle 5

Nr.	Präparate	b	N	Punkte
2	F 0,025 %	+ 0,25	0	0
3	38637 0,025 %	+ 0,26	0,01	20
11	A 41304 0,05 %	+ 0,30	0,05	100
13	H 1,0 %	+ 0,29	0,04	88

2. Für die WLF-Messung

Tabelle 6

Nr.	Präparate	b	N	Punkte
2	F 0,025 %	+ 0,98	0	0
3	38637 0,025 %	+ 1,19	0,21	7
11	A 41304 0,05 %	+ 3,93	2,95	100
13	H 1,0 %	+ 1,51	0,53	18

Der Gesamteffekt der Entzündungshemmung ergibt sich durch Addition der einzelnen Punkte.

Tabelle 7

Nr.	Präparate	Summe aller Pkt	T	WLF
2	F 0,025 %	0	0	0
3	38637 0,025 %	27	20	7
11	A 41304 0,05 %	200	100	100
13	H 1,0 %	98	80	18

Tabelle 7 zeigt, daß das Präparat Nr. 11 eindeutig an erster Stelle liegt, gefolgt von Präparat Nr. 13 und in einigem Punktabstand von Präparat Nr. 3 und Nr. 2. Auffällig ist, daß Präparat Nr. 13 in relativ großem Abstand auf Präparat Nr. 11 folgt. Wir werden darauf weiter unten eingehen.

Allgemein ergibt sich jedoch ein Bild, das dem der Parallelarbeit an menschlicher Haut entspricht, wo unter 15 Präparaten, die mit derselben Methode getestet und nach demselben Punktesystem aufgeschlüsselt wurden, die Corticosteroide Nr. 11 und Nr. 13 an erster Stelle und die Präparate Nr. 3 und Nr. 2 an 13. und 15. Stelle lagen. Die Präparate Nr. 2 und Nr. 3 zeichnen sich auch in unserem Versuch durch eine geringe entzündungshemmende Wirkung aus und erhalten ebenfalls eine eng beieinander liegende Placierung im Punktesystem (auch in derselben Reihenfolge). Analog erscheinen, durch einen grossen Punktabstand getrennt, Präparat Nr. 11 und Nr. 13 als die am besten entzündungshemmenden Corticosteroide, wieder in der entsprechenden Reihenfolge.

Wie schon von TRONNIER (37) angeführt, konnte auch an diesen Untersuchungen festgestellt werden, daß die Vasokonstriktion der einzelnen Corticosteroide, wenn überhaupt, nur unter größter Vorsicht der entzündungshemmenden Wirkung gleichgesetzt werden kann. Wäre eine Parallelität zwischen Vasokonstriktion und Entzündungshemmung vorhanden, müßten die in Abbildung 2 (s. Seite 14) dargestellten Geraden ebenfalls parallel verlaufen. Gegenteilig davon erscheint Präparat 11 bei der Entzündungshemmung punkthöher als bei der Vasokonstriktion, während Steroid Nr. 2 und Nr. 3 jeweils punktniedriger liegen. Wenn man von Präparat Nr. 13 einmal absieht, ließe sich der Schluß ziehen, daß Präparate, die eine geringe entzündungshemmende Wirkung auszeichnet - wie Nr. 2 und Nr. 3 - einen punktmäßig größeren Vasokonstriktionseffekt besitzen. Umgekehrt dazu zeigen Präparate mit hoher entzündungshemmender Wirkung einen geringen Vasokonstriktionseffekt, und damit ergibt sich auch hier eine weitgehende Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Parallelversuchs von BOES.

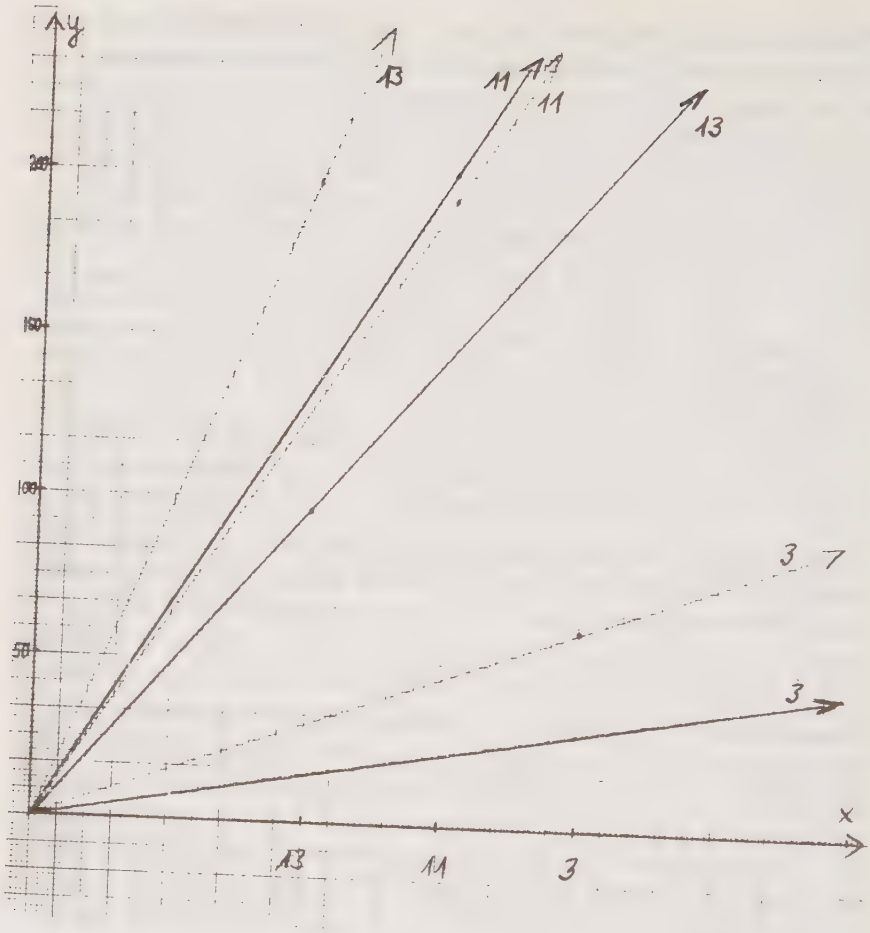

Abb. 2

Die roten Geraden stellen den Effekt der Entzündungshemmung (in Punkten auf der y-Abszisse) der jeweiligen Präparate (auf der x-Abszisse) dar.
Die schwarzen Geraden bezeichnen den vasokonstriktorischen Gesamteffekt (in Punkten auf der y-Abszisse) der Corticosteroide (auf der x-Abszisse).

Diskussion

Es ergibt sich ganz der Eindruck, daß es aufs erste gelungen zu sein scheint, einen Test am Meerschweinchen zu erarbeiten, der eine anschließende Übertragbarkeit der Wirksamkeit der geprüften Corticosteroidpräparate auf das menschliche Hautorgan zuläßt. Daß diese Ergebnisse, besonders die der zweiten Versuchsreihe, des Vorbehalts bedürfen, zeigt eine ziemlich große Streuung der einzelnen Meßwerte T und WLF untereinander und das Verhalten des Präparates Nr. 13, das entgegen der Ergebnisse im Parallelversuch und auch entgegen der Erfahrung, daß ein Präparat, das in der Temperaturmessung sehr gute Werte erzielt hat auch bei der Messung der WLF zu ähnlichen Werten gelangen sollte, mit am schlechtesten abschneidet und sich damit bei der Errechnung des Gesamteffektes der Entzündungshemmung aus T und WLF der relativ große Abstand von Präparat Nr. 11 zu Nr. 13 ergibt.
Diese Unregelmäßigkeiten, die wir 1. auf eine unterschiedliche Sensibilisierung - es ließen sich schon makroskopisch erhebliche Unterschiede feststellen - 2. auf eine sich laufend in sehr großem Maße wechselnde Stoffwechsellage der Versuchstiere, 3. auf einen noch nicht geklärten Stoffwechselhaushalt - hier wieder besonders der Histaminhaushalt, der dem des Menschen durchaus nicht ähnlich sein muß - und 4. auf eine große Schwankung der Meßwerte, bedingt durch die verschiedene Lage der einzelnen Testfelder (die durch den Kontrollwert bei einer verhältnismäßig geringen Zahl der von uns verwendeten Versuchstiere nicht ausgeglichen werden kann) zurückzuführen suchten, testeten wir in weiteren Versuchsserien.
Zu den Punkten im einzelnen: Wir waren aus organisationstechnischen Gründen auf eine gemischte Grün-Trocken-Futterung angewiesen. Wie schon von MAYER und SULZBERGER (18) zeigt, wird die Sensibilisierung bei einer Ernährung mit Trockenfutter gefördert, indem der pH des Blutes unter 7 fällt, durch Alkalisierung und dauernde Erhöhung des pH über 7 gehindert, wie dies bei Grünfutterernährung geschieht. Außerdem ließ sich feststellen, daß die Sensibilisierung durch Vitaminreichtum (Grünfutter) erschwert wird und wenn sie schon eingetreten war, wesentlich abgeschwächt wurde. Dies wird auch von FREY (8) bestätigt.

Bei unseren Versuchen, in denen wir Meerschweinchen, getrennt nach Trocken- und Grünfutter sensibilisierten und auf ihre Reaktion bei Auslösung des Kontaktekzems mit DNCB testeten, erzielten wir Ergebnisse, die sich mit denen von SULZBERGER deckten. Es ließe sich somit vermuten, daß es sich bei unseren mit Gemischtfutter (je nach Angebot) versorgten Versuchstieren um einen stets wechselnden Sensibilisierungsgrad und eine nicht ausgeglichene Reaktionslage handelte.

Ebenfalls für die Sensibilisierung verantwortlich machte M. ROCKWELL (24) die Umgebung der Versuchstiere. Umweltsbedingungen von 94° F und 90 % rel. Luftfeuchtigkeit während der Sensibilisierungsphase und bei der anschließenden Auslösung mit DNCB, führten zu einer herabgesetzten Reaktionsfähigkeit der Haut. Umweltbedingungen von 41-42° F und 61-77 % rel. Luftfeuchtigkeit führten zu vermehrter Reaktion gegenüber DNCB. Da in unserem Tierstall keine Klimaanlage installiert war, hatten wir es je nach Außentemperatur und Witterung mit einer sehr unterschiedlichen und häufig wechselnden Innenatmosphäre zu tun, die wie oben ausgeführt, sehr wohl einen Einfluß auf die Meßergebnisse nehmen kann.

Eine ständig wechselnde Stoffwechsellage ergab sich aus einer weiteren Testserie, in der wir die Meßwerte T und WLF auf den jeweiligen 4 Feldern bei 10 Meerschweinchen a) in kurzem Abstand hintereinander, b) nach 15 Minuten, c) nach 30 Minuten und d) nach Stresseinwirkung untersuchten. Die einzelnen Ergebnisse werden aus den Tabellen A und B ersichtlich.

Änderung der Temperatur auf allen Feldern nach den einzelnen Messungen:

Tabelle A

Zeitabstand	Mittelwert T
2. Messung (sofort auf die Grundmessung folgend)	- 0,087
nach 15 Min.	- 0,25
nach 30 Min.	- 0,30
nach Stress	- 1,105

Das ergibt für die gesamte Temperaturänderung der einzelnen Felder folgende Mittelwerte:

Tabelle B

Temperaturänderung	Mittelwert T
Feld 1	- 0,184
Feld 2	- 0,54
Feld 3	- 0,457
Feld 4	- 0,553

Die Änderung aller T-Messungen gegenüber der Grundmessung ergeben den Mittelwert T = - 0,512.

Für die WLF ergibt sich folgendes Bild:

Änderung der WLF auf allen Feldern nach den einzelnen Messungen:

Tabelle C

Zeitabstand	Mittelwert WLF
2. Messung (sofort auf die Grundmessung folgend)	- 0,423
nach 15 Min.	- 0,275
nach 30 Min.	- 0,35
nach Stress	+ 0,925

Das ergibt für die gesamte WLF-Änderung der einzelnen Felder folgende Mittelwerte:

Tabelle D

WLF-Änderung	Mittelwert WLF
Feld 1	- 0,1
Feld 2	- 0,166
Feld 3	+ 0,23
Feld 4	+ 0,43

Die Änderung aller WLF-Messungen gegenüber der Grundmessung ergeben den Mittelwert WLF = + 0,123.

Aus den Tabellen A und C geht hervor, daß besonders Stresseinwirkung die Meßergebnisse in hohem Maß beeinflußt. Wir stellten fest, daß Meerschweinchen während unserer Messungen innerhalb kürzester Zeit durch Veränderung ihres gewohnten Milieus wie Anfassen mit der Hand oder Anlegen einer Elektrode in Stresszustände gerieten.

Wertet man die Einzelergebnisse des letzten Tests in Hinsicht auf eventuelle Unterschiede der Meßwerte verschieden lokalisierter Versuchsfelder aus, so ergibt sich ein Mittelwert der Temperaturänderung auf dem Rücken von T = - 0,369 gegenüber einem Mittelwert von T = - 0,513 auf dem Bauch. Dies entspricht weitgehend Beobachtungen, die von STORCK, STERN und BANDMANN (33/31/3) angestellt wurden, die die einzelnen Hautregionen der Meerschweinchen als abhängig von ihrer Innervation und Blutversorgung beschrieben haben. Da wir gezwungen waren die Felder kreisförmig um die Meerschweinchen anzulegen, hatten wir von Feld zu Feld wechselnde Grundbedingungen, die zu einer weiteren Verschiebung der Einzelergebnisse beitragen konnten.

Noch ein kurzes Wort zum Histaminhaushalt der Meerschweinchen. SCHNITZER (28) und RÊDEI (23) weisen auf eine Verstärkung der allergischen Reaktion durch Histaminausschüttung und dadurch bedingte Erweiterung der Kapillaren, passagere Alkalisierung und Permeabilitätssteigerung der Grenzflächen hin. GRÖF (10) zeigt in seiner Untersuchung, daß nach Hautreizen allergischen Ursprungs sich manifestierende Gefäßreaktionen dadurch hervorgerufen werden, daß das ursprünglich gewebsgebundene Histamin zum Teil frei und biologisch aktiv wird. Maßgebend dafür sei das Verhältnis des freien Histamins zum Gesamt-Histamin bei gereizter und ungereizter Haut. Betont wird, daß der wahre Histaminumlauf, der von vielen unbekannten Faktoren abhängig ist, noch nicht völlig erkannt sei. Hier ergeben sich ebenfalls erschwerende Faktoren, besonders im Hinblick auf eine vergleichende Betrachtungsweise der Ergebnisse gegenüber denen an menschlicher Haut. Was ebenfalls noch einer Verfeinerung der Methodik bedarf, sind die Befestigungsmaterialien für Porotestpflaster und Occlusivverband. Daß die Pflasterreizung (durch Bandpflaster wie Leukoplast) auch bei größerem Abstand vom Testfeld und noch nach längerer Wartezeit zwischen dem Abheben des Verbandes und der Messung der einzelnen Felder, Irritationen der Haut und besonders zusätzliche ekzematöse Reaktionen, bedingt durch verschiedene in der Pflastermasse enthaltene Ingredienzen, hervorruft, die über die Stadien Erythem, Ödem bis zur Bläschenbildung verlaufen können, wird auch von

RUSSEL (25) festgestellt. Andere verwendete Klebestreifen, die weniger mit Klebemasse beschichtet waren, hielten wiederum die Belastung nicht aus.

Zusammenfassung

Wir können abschließend bemerken, daß es bei den von uns verwandten Präparaten F 0,025 %, 38637 0,025 %, A 41304 0,05 %, H 1,0 % möglich war, eine Testart an Meerschweinchen zu entwickeln und die Ergebnisse einem Vergleich mit denselben an menschlicher Haut getesteten Corticosteroiden zuzuführen, mit dem Resultat einer großen Übereinstimmung. Dazu müssen aber folgende Einschränkungen zunächst prinzipieller Art gemacht werden. Bevor mit dieser Testart zuverlässig, d.h. ohne Parallelversuche am Menschen, Aussagen über die Wirkungsweise von Corticosteroiden gemacht werden können, müßte in Versuchsreihen der Histaminhaushalt des Meerschweinchens in seiner Auswirkung auf allergische Reaktionen und damit eventueller Verschiedenheiten zum menschlichen Vergleichsorgan getestet werden. Die zukünftige Aussperrung dieses Faktors aus dem Problemkreis ist wohl durch unsere verhältnismäßig kleinen Versuchsreihen noch nicht bewiesen worden.

Weitere Einschränkungen, die sich bei unserem Versuchsablauf durch unterschiedliche Sensibilisierung, veränderliche Stoffwechsellage und Schwankungen der Meßwerte auf den verschiedenen Testfeldern zu ergeben schienen, glauben wir durch verschiedene Vorsichtsmaßnahmen umgehen zu können:

a) Eintemperierte Räume mit den für die Versuchstieren geeigneten Werten.
b) Trockenfütterung
c) Vermeidung jeglicher Stresszustände der Tiere
d) Große Anzahl von Versuchstieren um die WLF- und Temperaturänderung der verschiedenen Körperpartien untereinander abzufangen
e) Verwendung von unproblematischem Befestigungsmaterial

Weiteren Versuchen in dieser Richtung wird es vorbehalten sein, die Problematik dieser Untersuchungen noch gänzlich abzuklären.

Literaturverzeichnis

1. BAER, L. u. ROSENTHAL, A. : Kontaktdermatitis mit Spongiose und intraepidermaler Bläschenbildung in der akantotischen Haut von Meerschweinchen
   J. Invest. Dermat. 27, 249-253, (1956)
2. BANDMANN, H.J. : Der Wert histologischer, allergologischer Untersuchungen, dargelegt am Beispiel der Histopathologie des exp. allergischen Kontaktekzems
   Proz. 12 internat. Congr. Derm. 2, 1082-1085, (1962)
3. BANDMANN, H.J. u. ROHBACH, B. : Die exp. Testreaktion und ihre Abhängigkeit von dem Auflageort der Läppchenprobe
   Arch. Klin. exp. Dermat. 220, 155-159, (1964)
4. BOES, M. : Zur exp. Prüfung gelöster Steroide auf der Haut
   Diss. Eberhard-Karls Universität Tübingen (1969)
5. BORELLI, S. : Histologie von Läppchenproben mit Kaltwellpräparaten zur Untersuchung von toxischen und allergischen Testreaktionen
   Hautarzt 8, 498-502, (1957)
6. CHARPY, J., STAHL, A. CATELAIN, P.Y. : Histologische und chronologische Studie über den Aufbau der Ekzem-Efflorescenz
   Semaine-Hôp. 2624, (1953)
7. DEPAOLI, M. : Exp. Untersuchungen und Betrachtungen zur cutanen Kontaktsensibilisierung
   Minerva dermat. (Torino), 31, 37-39, (1956)
8. FREY, J.R. : Quant. Untersuchungen bei epidermaler Sensibilisierung von Meerschweinchen mit DNCB
   Dermatologica (Basel) 102, 1-5, (1951)
9. FREY, J.R. u. WENK, P. : Exp. Studien über die Pathogenese des Kontaktekzems beim Meerschweinchen
   Immunol. 11, 81-85, (1957)

10. GRÖF, P. : Exp. Daten zum Umlauf des freien Histamins in der gereizten Haut. Lokale durch chemische Reize verursachte Änderung des freien Histamingehaltes der Kaninchenhaut
Börgyogy. vener. Szle. 41, 149-152, (1965)

11. HAENSCH, R. : Dermatotherapeutische Gesichtspunkte bei der äußeren Cortison-Anwendung
Fette, I,209, (1965)

12. HAXTHAUSEN, H. : Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Cortisonpräparate auf exp. erzeugte ekzematöse Reaktionen
Acta dermatol. vener. (Stockh.) 36, 381-390, (1956)

13. HEINECKE, F. : Prüfung verschiedener Corticosteroide im Hinblick auf ihre Vasokonstriktion und Entzündungshemmung an der menschl. Haut
Diss. Eberhard-Karls Universität Tübingen (1969)

14. HEITE, H.J. u. LINDNER, A. : Über die Planung und Auswertung einer Rechts-Links Behandlung bei dermato-therapeutischen Untersuchungen
Dermatologica 125, 65-80 (1962)

15. HEITE, H.J. u. ROMMEL, F. : Über den Einfluß Hydrocortison bzw. Prednisolon auf die exp. Akanthose
Derm. Wschr. 138, 1005-1011, (1958)

16. HUNZIGER, N. u. JADASSOHN, W. : Bemerkungen zum exp. Kontaktekzems des Meerschweinchens
Hautarzt 15, 104-106, (1964)

17. KLASCHKA, F. : Tierexp. Studien zum Kontaktekzem I.
Arch. Klin. exp. Derm. 218, 475-481, (1964)

18. MAYER, R.L. u. SULZBERGER, M. : Zur jahreszeitlichen Schwankungen der Krankheiten. Einfluß der Kost auf die exp. Sensibilisierung
Arch. für Derm. u. Syph. 163, 245-251, (1931)

19. MC. KENZIE, A.W. : Percutaneous absorption of steroids
Arch. Derm. 86, 611-614, (1962)

20. MC. KENZIE, A.W. u. STEOUGHTON, R.B. : Method for comparing percutaneous absorption of steroids
Arch. Derm. 86, 608-610, (1962)

21. MONTAGNER, W. u. YUN, J.S. : The skin of the domestic pig
J. invest. Derm. 42, 11-16, (1964)
22. OBERSTE-LEHN, H. : Die Meerschweinchenhaut als dermatologisches Testobjekt
Arch. Klin. exp. Derm. 209, 539-545, (1959)
23. RÉDEI, A. u. KAVÁDY, S. : Die Bedeutung der Kappilarpermeabilität beim Pathomechanismus der allergischen Sensibilisierung
Allergie und Asthma 2, 79-85, (1956)
24. ROCKWELL, E.M. : Untersuchungen über mehrere Faktoren, die die Kontaktirritation und Sensibilisierung beeinflussen
J. Invest. Dermat. 24, 35-42, (1955)
25. RUSSELL, B. u. THORNE, N.A. : Hautreaktionen durch Heftpflaster
Lancet I 67, (1955)
26. SCHENK, J. u. HEITE, H.J. : Die epidermal sensibilisierte Schweinehaut als Testobjekt zur vergleichenden Prüfung corticoidhaltiger Salben.
Arch. Klin. u. exp. Dermat. 222, 91-99, (1965)
27. SCHNEIDER, W. : Corticosteroidtherapie in der Dermatologie
Dtsch. med. Wschr. 84, 2219-2222, (1959)
28. SCHNITZER, A. : Exp. Untersuchungen zum Problem der Sensibilisierungen
Dermatologica (Basel) 112, 479-488, (1956)
29. SCHÖNEFELD, W. SCHNEIDER, W. : Lehrbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten
G. Thieme-Verlag, Stuttgart (1965)
30. SIEMENS, H.W. : Die Technik der Rechts-Links Behandlung für den Praktiker
Hautarzt 38, 307-311 (1952)
31. STERN, P. : Die Bedeutung des Histamins in der Entstehung des Ekzems
Arch. internat. Pharmacodynamic 105, 279-285, (1956)
32. STEVENS, M.A. : Use of the albino guinea pigs to Detect the Skin-Sensitizing ability of Chemicals
33. STORCK, H. : Tierexp. Untersuchungen über ekzematöse Sensibilisierung
Referat zur 21. Tagung der deutschen derm. Gesell. Heidelberg, Okt. 1949

34. STORCK, H. : Eignung der verschiedenen Spezies zur exp. Sensibilisierung
Handbuch der Haut- u. Geschlechtskrankheiten II/1
119-126, (1962)

35. SULZBERGER, M.B. u. WITTEN, V.H. : Thin Pliable Plastic Films in Topical Dermatological Therapy
Arch. Derm. 84, 1027-1034, (1961)

36. TRONNIER, H. : Über die exp. Prüfung von entzündungshemmenden Steroiden an der menschlichen Haut
Berufsdermatosen 8, Heft 1, (1960)

37. TRONNIER, H. : Zur externen Anwendung von Corticosteroiden und zur Prüfung ihrer Wirksamkeit
Der Landarzt, 44. Jahrg., Heft 5, 227-233, (1968)

38. WELTGÄSSER, H. : Über die Prüfung der lokalen Wirkung von Corticoidzellen am Beispiel des 6.- Chlorprednisonacetats
Zschr. H.- u. Geschl. Krkh. 34, 293-298, (1963)

39. WITTEN, V.A. u. STEIN, S.I. : Use of Thin Pliable Plastic Films in selected Dermatoses
Arch. Derm. 87, 458-466, (1963)

40. ZELIGMANN, J. : Exp. Kontaktdermatitis bei Meerschweinchen mit DNCB
J. Invest. Dermat. 22, 109-115, (1954)

Am Schluß meiner Arbeit ist es mir ein besonderes Anliegen, Herrn Professor Dr. Wilhelm Schneider dafür zu danken, daß er mir die Möglichkeit bot, an der Universitäts-Hautklinik Tübingen eine experimentelle Arbeit abzulegen.
Ebenso möchte ich Herrn Professor Dr. med. Hagen Tronnier für die Überlassung des Themas und das Interesse, das er meiner Arbeit jederzeit entgegenbrachte, aufrichtig danken.

Lebenslauf

Am 18.5.1943 wurde ich, Klaus-Jürgen Welcker, als Sohn der Eheleute Dr. Kurt Welcker und Isolde, geb. Steinert, in Glauchau/Sa. geboren. Ich besuchte die Volksschule und das Progymnasium in Leutkirch und ab 7. April 1959 das Gymnasium in Wangen/Allg., wo ich am 22.3.1962 die Reifeprüfung ablegte.

Am 28. April 1962 wurde ich an der Eberhard-Karls Universität Tübingen erstimmatrikuliert. An dieser Universität bestand ich am 23. Februar 1965 die zahnärztliche Vorprüfung und studierte ohne Unterbrechung bis zur Ablegung des Staatsexamens am 14. Dezember 1967.